

549816

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/083413 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003578
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 17 日 (17.03.2004) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-077123 2003 年 3 月 20 日 (20.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人乙卯研究所 (RESEARCH FOUNDATION ITSUU LABORATORY) [JP/JP]; 〒1580094 東京都世田谷区 玉川 2 丁目 2 8 番 1 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浅島 誠 (ASASHIMA, Makoto) [JP/JP]; 〒1700005 東京都豊島区南大塚 3-40-9 Tokyo (JP). 浜崎 辰夫 (HAMAZAKI, Tatsuo) [JP/JP]; 〒1660001 東京都杉並区阿佐ヶ谷北 3-12-2 Tokyo (JP). 影近 弘之 (KAGECHIKA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1780062 東京都練馬区大泉町 2-39-6 Tokyo (JP). 首藤 紘一 (SHUDO, Koichi) [JP/JP]; 〒1680073 東京都杉並区下高井戸 5-9-18 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ORGAN-FORMING METHOD

(54) 発明の名称: 器官形成方法

(57) Abstract: A method of forming an organ and/or a tissue from an undifferentiated vertebrate cell *in vitro* involving the step of culturing undifferentiated vertebrate cells in the presence of a retinoic acid X receptor ligand (for example, an agonist or an antagonist to retinoic acid X receptor); a method of forming spleen from an undifferentiated vertebrate cell *in vitro*; and a method of forming a tissue having the form and functions of spleen from an undifferentiated vertebrate cell *in vitro* involving the step of culturing undifferentiated vertebrate cells in the presence of a retinoic acid X receptor ligand substantially not binding to retinoic acid receptor subtype γ and activin.

(57) 要約: 脊椎動物の未分化細胞から器官及び/又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸 X 受容体リガンド (例えばレチノイン酸 X 受容体のアゴニスト又はアンタゴニスト) の存在下で培養する工程を含む方法、及び脊椎動物の未分化細胞から脾臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から脾臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプ γ に実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法。

WO 2004/083413 A1

明 細 書

器官形成方法

技術分野

本発明は脊椎動物の未分化細胞から器官を形成する方法に関する。

背景技術

ヒトを含めて脊椎動物の生体には非常に沢山の器官や組織が存在しているが、それらはもともと1個の受精卵から細胞分裂(卵割)と細胞分化を経て形成され、バランスのとれた体制をもつ個体を構成するようになる。このような器官及び組織形成のプロセスはきわめて複雑であり、誘導現象と呼ばれる重要な細胞間の相互作用が多段階にわたって行われていると考えられている。

生体内で行われる器官形成のプロセスを試験管内(イン・ビトロ)で再現し、未分化細胞から所望の器官を形成する試みがなされている(例えば、「未分化細胞からの臓器形成」、炎症・再生、Vol. 22, 21, 2002、脾臓の器官形成については特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報を参照のこと)。例えば、イモリの胞胚期のアニマルキャップ(多能性をもった細胞塊)である未分化細胞を高濃度のアクチビンで処理するとリズミカルに拍動する心臓を60%の形成率で形成することができる。この心臓は、1ヶ月以上も正常な拍動数を維持することができ、心筋細胞に特異的な遺伝子の発現や心筋に特異的な介在板の存在なども確認できることから、機能的及び構造的にほぼ完全な心臓であると言える。

一方、レチノイン酸(ビタミンA酸)はビタミンAの活性代謝産物であり、発生途上にある未熟な細胞を特異的な機能を有する成熟細胞へと分化させる作用や、細胞の増殖促進作用や生命維持作用などの極めて重要な生理作用を有している。これまでに合成された種々のビタミンA誘導体、例えば、特開昭 61-22047 号公報や特開昭 61-76440 号公報記載の安息香酸誘導体、及びジャーナル・オブ・メディ

シナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry, 1988, Vol. 31, No. 11, p. 2182) に記載の化合物なども、同様な生理作用を有することが明らかにされている。レチノイン酸及びレチノイン酸様の生物活性を有する上記化合物は「レチノイド」と総称されている。

レチノイン酸は前後軸に沿った胚のパターンニングに対する調節因子であり (Nature 340, 140-144, 1989、Development 112, 945-958, 1991、Dev. Biol. 192, 1-16, 1997、Zool. Sci. 15, 879-886, 1998)、このレチノイン酸がツメガエル胚における前方神経組織を後方化させ、中胚葉の発達において影響を及ぼすことが知られている (Genes Dev. 5, 175-187, 1991、Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993)。また、ツメガエルアニマルキャップ細胞にアクチビンの投与量を変化させて処理することにより脊索、筋肉、間充織及び体腔上皮のようなほとんどの中胚葉組織を誘導することができること (Roux's Arch. Dev. Biol. 198, 330-335, 1990、Nature 347, 391-394, 1990、Roux's Arch. Dev. Biol. 200, 230-233, 1991)、及びアクチビンと共処理するレチノイン酸の投与量を変化させることにより、アニマルキャップ細胞から分化する脊索、筋肉及び前腎のような中胚葉組織を側後方化させること (Develop. Growth. Differ. 35, 123-128, 1993) が報告されている。

内胚葉性器官に対するレチノイン酸の作用については、発生段階 22~32 のツメガエル胚をレチノイン酸で処理すると、腸、肝臓、胃などの消化器官の形態が異常になると、Dixon らにより報告されているが、レチノイン酸で処理した発生段階 22~32 のツメガエル胚の膵臓は正常に形成され、内胚葉特異的マーカーである *XlHbox8* の発現にも影響がみられないことも報告されている (Dev. Genes Evol. 208, 318-326, 1998)。

また、オール・トランス (all-trans) ・レチノイン酸は、細胞核内に存在する核内受容体・スーパーファミリー (Evans, R.M., Science, 240, p. 889, 1988) に属するレチノイン酸受容体 (RAR) にリガンドとして結合して、動物細胞の増殖・分化あるいは細胞死などを制御することが明らかにされている (Petkovich, M.,

et al., Nature, 330, pp. 444-450, 1987)。このオール・トランス・レチノイン酸を用いて、あるいはオール・トランス・レチノイン酸とアクチビンを組み合わせて用いることによって脾臓をインビトロで形成できることが知られている（特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報）。

レチノイン酸の生理活性の発現については、レチノイドX受容体(RXR, 9-cis-レチノイン酸を天然リガンドとする：本化合物は RAR のリガンドでもある)の存在が証明されている。RXR は RAR と二量体を形成し、遺伝子の転写を惹起ないし抑制してレチノイン酸の生理活性の発現を調節していることが明らかにされている(Mangelsdorf, D.J. et al., Nature, 345, pp. 224-229)。RXR に結合可能なアゴニスト又はアンタゴニストが種々知られているが（アゴニストとしては、例えば特開平 10-59951 号公報に記載された HX600 など、アンタゴニストとしては同公報に記載された HX603 など）、RXR に結合するリガンドを用いて未分化細胞から器官を形成できるか否かは従来全く知られていない。

発明の開示

本発明の課題は、脊椎動物の未分化細胞から所望の器官を形成する手段を提供することにある。本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、RXR に結合するリガンドを用いて未分化細胞から心臓や神経などの器官を形成できることを見出した。また、本発明者らは、RAR リガンドとしてレチノイン酸受容体(RAR)サブタイプに実質的に結合しない RAR リガンドとアクチビンとを用いると、未分化細胞から高度に分化した脾臓を形成できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明により、脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、レチノイン酸X受容体リガンドがレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである上記の方法、形成される器官及び／又は組織が

心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である上記の方法が提供される。また、脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸X受容体リガンドを含む分化誘導剤が本発明により提供される。

別の観点からは、脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、上記のレチノイン酸受容体リガンドが 4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル) カルバモイル] 安息香酸である上記の方法が提供される。また、脊椎動物の未分化細胞から膵臓又は膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンドを含む分化誘導剤も本発明により提供される。

また、別の観点からは、本発明により、上記の方法で形成された器官及び／又は組織が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、ES細胞のコロニーを示した写真である。

第2図は、バクテリアディッシュで形成された胚様体を示した写真である。

第3図は、例1の方法で形成された心臓（心筋様細胞塊）を示した写真である。

第4図は、例2の方法で形成された平滑筋組織（平滑筋様細胞塊）を示した写真である。

第5図は、例2の方法で形成された脂肪細胞組織を示した写真である。

第6図は、例3の方法により胚葉体から分化誘導された膵臓導管や内分泌・外分泌細胞などを含む膵臓組織の写真である。

第7図は、例3の方法により誘導された膵臓の外分泌細胞を示した写真である。

第8図は、例3の方法により誘導された膵臓の β 細胞（内分泌細胞）を示した写真である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において「器官及び／又は組織」とは、脊椎動物を構成する器官、組織、及びそれらの結合物を意味している。例えば、本発明の方法により形成される器官には、通常は組織として分類される構造物が結合している場合もあるが、そのような結合物を形成する方法も本発明の範囲に包含される。また、本発明の方法により同時に形成される器官及び組織はそれぞれ2種以上であってもよい。器官としては、例えば心臓、膵臓、腎臓などを例示することができ、組織としては神経組織、平滑筋組織、脂肪細胞組織などを例示することができるが、これらに限定されることはない。器官としては心臓又は膵臓などが好ましく、組織としては平滑筋組織又は脂肪組織などが好ましい。

レチノイン酸X受容体リガンド（以下、RXR リガンドと呼ぶ場合がある）には、レチノイン酸X受容体のアゴニスト（以下、RXR アゴニストと呼ぶ場合がある）及びレチノイン酸X受容体のアンタゴニスト（以下、RXR アンタゴニストと呼ぶ場合がある）が包含される。ある物質がRXR リガンドとなりうるか否かは、例えば Boehm, M. F., et al., J. Med. Chem., 37(18), 2930-2941, 1994; Heyman, R. A., et al., Cell, 68(2), 397-406, 1992; Levin, A. A., et al., Nature, 355(6358), 359-361, 1992; Chen, J. Y., et al., Nature, 382, 819-822, 1996 などに記載された方法により当業者が容易に確認することができる。RXR リガンドとしては、例えば、特開平 9-100270 号公報、特開平 10-59951 号公報、特開平 10-114757 号公報、特開平 10-237050 号公報、特開平 10-338658 号公報、特開 2000-273079 号公報、国際公開 WO 99/24415 などに記載された化合物のうち RXR リガンドとして作用可能な化合物を用いることができるが、これらに限定されることはない。RXR リガンドは2種以上を組み合わせ用いてもよい。RXR アゴニス

トと RXR アンタゴニストとを組み合わせることも可能である。

より具体的には、RXR アゴニストとしては、例えば、

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX600)；

4-[2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, f][1, 4]チアゼピン-11-イル]安息香酸(HX630)；

4-[2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, e]アゼピン-11-イル]安息香酸(HX640)；

4-[1, 3-ジヒドロ-7, 8-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸(HX801)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン(TZ191)；

(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン(TZ335)；

4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸(DA124)；

2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリジン-5-カルボン酸(PA024)；

4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1, 3-ジオキサラン-1-イル]安息香酸(SR11237)；

4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸(LGD1069)；及び

6-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シクロプロプ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸(LG268)などを挙げることができる。

RXR アンタゴニストとしては、

4-(5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトロジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX531)；

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸(HX603) ;

4-(5H-10, 11-ジヒドロ-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5, 10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸(HX711) ;

2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸(PA452) ;

5-[4-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン(Tp180) ;

(2E, 4E, 6Z)-3-メチル-7-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2, 4, 6-トリエン酸(LG100754) ; 及び

4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸などが挙げられる。もともと、RXR アゴニスト及び RXR アンタゴニストはこれらの特定の化合物に限定されることはない。

本発明の方法に使用可能な脊椎動物の未分化細胞の種類は特に限定されないが、例えば、哺乳類動物のほか、鳥類、は虫類、両生類などの脊椎動物の未分化細胞を用いることができる。未分化細胞としては、胚性幹細胞、造血幹細胞、小腸クリプトの基底細胞などの幹細胞のほか、例えば中～後期の胞胚のアニマルキャップや胚様体(embryoid body)などの細胞集団を用いることもできる。本明細書において用いられる「未分化細胞」の用語は、2以上の細胞により形成される細胞集団や細胞塊を排除するものと解釈してはならない。

本発明の方法による器官及び／又は組織形成は、未分化細胞からの器官及び／又は組織形成方法として当業界で利用されている種々の方法で行うことができる。例えば、未分化細胞から脾臓を形成する方法について特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報に詳細に記載されているので、当業者はこれらの刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例の方法に従って、未分化細胞から所望の器官を形成させることができる。特開 2001-299335 号公報及び特開 2001-333770 号公報の開示のすべてを参照として本明細書の開示に含める。

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体を用いて、適宜の濃度の RXR リガンドの存在下で 1 ないし数日培養することにより器官形成を行うことができる。RXR リガンドの存在下で 1 ないし数日培養した後、RXR リガンドの非存在下でさらに培養を継続してもよい。RXR リガンドの濃度は特に限定されないが、例えば $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$ 程度の範囲から適宜選択できる。本発明の方法はイン・ビトロの環境下で行うことができるが、本明細書においてイン・ビトロの用語は「生体外」の意味で用いられており、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

例えば、胚性幹細胞 (ES 細胞) としては、Hooper によって樹立された 129 系マウスの E14 細胞 (ATCC #; CRL-1821) 又は Ledermann and Burki によって樹立された C57BL 系マウスの B6 (ATCC #; SCRC-1002) などを用いることができる。これらはマウス胚盤胞の内部細胞塊からライン化されたものである。もっとも、胚性幹細胞の種類はこれらに限定されることはない。なお、通常の場合、胚性幹細胞の継代数は器官及び／又は組織形成能に影響を及ぼさない。

例えば、胚性幹細胞から誘導した胚様体をゼラチンコートした培養皿に接着させた後、RXR リガンドの溶液を必要に応じて培地で希釈して培地に加えて 1 から数日処理する。RXR リガンドを溶解するための溶媒としては、水、生理食塩水、緩衝液などのほか、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒又は水と有機溶媒との混合物を用いることもできる。胚様体の培養には、必要に応じてラミニン、コラーゲン I やマトリゲルコート (Biocoat, Becton Dickinson 社製) したマルチウェルプレートを用いることもできる。この処理後、一定時間後の細胞分化状態を記録することが望ましい。上記の処理の前後に、骨形成因子 (Bone morphogenic protein, BMP) である BMP2/4 や BMP6/7 のほか、FGF、アクチビン、フォリスタチン、ビデログニン、インスリン、グルカゴン、コンカナバリン、サイトカラシン、カドベリンなどの誘導因子、細胞増殖因子、又はサイトカイン類などを用いて処理することもできる。このような処理を採用することにより、器官及び／又は組織形成の方向性や形成率を高めることができる場合がある。

別の観点から提供される本発明の方法は、脊椎動物の未分化細胞から臍臓をイ

ンビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から腭臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプ γ に実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含むことを特徴としている。

レチノイン酸受容体 (RAR) リガンド (以下、RAR リガンドと呼ぶ場合がある) は、オールトランス-レチノイン酸または 9-シス-レチノイン酸が生理作用を発現するために必要な受容体に結合する性質を有する化合物である。本発明の方法には、好ましくはレチノイン酸受容体アゴニスト (以下、RAR アゴニストと呼ぶ場合がある) としてレチノイン酸に類似する作用 (例えば、細胞分化作用、細胞増殖促進作用、及び生命維持作用などの 1 種以上の作用) 又はその一部の作用を発揮する RAR リガンドを用いることができる。RAR リガンドであるか否かは、M. Sporn et al., *Retinoids*, Academic Press, 1984 に記載された種々の方法により容易に判定できる。本発明の方法で用いられる RAR リガンドは、RAR のサブタイプ α (RAR α) 及びサブタイプ β (RAR β) に結合し、かつサブタイプ γ (RAR γ) には実質的に結合しない RAR リガンドである。レチノイン酸受容体・サブタイプへの結合については文献記載の方法により容易に確認することができる (H. de The, and A. Dejean, "Retinoids, 10 years on", Basel, Karger, pp. 2-9, 1991)。

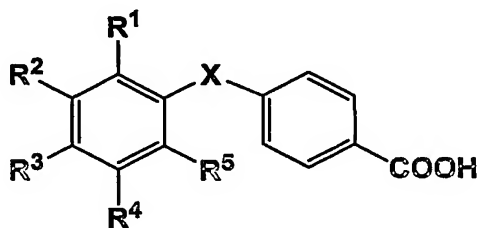
上記の性質を有する RAR リガンドとしては、例えば、フェニル置換カルバモイル安息香酸又はフェニル置換カルボキサミド安息香酸を基本骨格とする RAR アゴニストを用いることができる。フェニル置換カルバモイル安息香酸又はフェニル置換カルボキサミド安息香酸を基本骨格とする RAR リガンドは種々知られている。基本骨格という用語は、1 又は 2 以上の任意の置換基が結合するための主たる化学構造を意味する。通常は、カルバモイル基又はカルボキサミド基に置換するフェニル基が 1 個又は 2 個以上の置換基を有していることが好ましい。このような置換基としては、例えば、低級アルキル基を用いることができる (本明細書において低級とは炭素数 1 ないし 6 個程度、好ましくは炭素数 1 ないし 4 個を意味する)。低級アルキル基としては直鎖又は分枝鎖のアルキル基が好ましく、より具体

的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、又は tert-ブチル基などを挙げることができる。

また、上記のフェニル基上の置換基として、例えば、メトキシ基などの低級アルコキシ基、ハロゲン原子（ハロゲン原子としてはフッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、例えばトリメチルシリル基などの低級アルキル置換シリル基などを挙げることができる。カルバモイル基に置換するフェニル基としては、例えば、2ないし4個の低級アルキル基で置換されたフェニル基、あるいは1又は2個のトリ低級アルキルシリル基で置換されたフェニル基などが好ましく、2ないし4個のアルキル基で置換されたフェニル基、又は2個のトリメチルシリル基で置換されたフェニル基などがより好ましい。

上記のフェニル基上に置換する2個の低級アルキル基が隣接する場合には、それらの2つの低級アルキル基は一緒になってそれらが結合するフェニル基の環構成炭素原子とともに5員環又は6員環を1個又は2個、好ましくは1個形成してもよい。このようにして形成される環は飽和でも不飽和でもよく、環上には1又は2個以上の低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基などが置換していてもよい。上記の形成された環上には、好ましくは2～4個のメチル基、さらに好ましくは4個のメチル基が置換していてもよい。例えば、フェニル環上に置換する2個の隣接する低級アルキル基が一緒になって5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環や5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環などが形成されることが好ましい。

好ましい RAR リガンドとしては、例えば、下記の一般式(I)：



〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子、低級アルキル基、又は低級アルキル置換シリル基を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 のうち隣接するいずれか2つの基が低級アルキル基である場合には、それらが一緒になってそれらが結合するベンゼン環上の炭素原子とともに5員環又は6員環を形成してもよく（該環は1又は2以上のアルキル基を有していてもよい）、Xは-CONH-又は-NHCO-を示す〕で表されるRARリガンドを挙げることができる。

上記一般式(I)において、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 が示す低級アルキル基としては、炭素数1ないし6個程度、好ましくは炭素数1ないし4個の直鎖又は分枝鎖のアルキル基を用いることができる。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は *tert*-ブチル基などを用いることができる。上記の低級アルキル基上には1個又は2個以上の任意の置換基が存在していてもよい。置換基としては、例えば、水酸基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子などを例示することができる。 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 が示す低級アルキル置換シリル基としては、例えば、トリメチルシリル基などを挙げることができる。

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 からなる群から選ばれる隣接する2つの低級アルキル基が一緒になって、それらが結合するベンゼン環上の炭素原子とともに5員環又は6員環を1個又は2個、好ましくは1個形成してもよい。このようにして形成される環は飽和、部分飽和、又は芳香族のいずれであってもよく、環上には1又は2以上のアルキル基を有していてもよい。環上に置換可能なアルキル基としては、炭素数1ないし6個程度、好ましくは炭素数1ないし4個の直鎖又は分枝鎖のアルキル基を用いることができる。例えば、メチル基、エチル基などを用いることができ、好ましくは2～4個のメチル基、さらに好ましくは4個のメチル基が置換していてもよい。例えば、 R^2 及び R^3 が置換するベンゼン環と R^2 及び R^3 とにより、5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環や5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン環などが形成されることが好ましい。

より具体的には、本発明の方法に好適に用いられるRARリガンドとして、

4-(2, 4-ビストリメチルシリルフェニルカルボキサミド)安息香酸(Am555s, J. Med. Chem., 33, pp. 1430-1437, 1990)又は 4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル)カルバモイル]安息香酸(Am80, Hashimoto, Y., Cell struct. Funct., 16, pp. 113-123, 1991; Hashimoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 166, pp. 1300-1307, 1990)などを挙げることができ、特に好ましい RAR リガンドは Am80 である。

本発明の方法は、脊椎動物の未分化細胞を上記の RAR リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含んでいる。未分化細胞及び培養方法は上記に説明したものをを用いることができる。本発明の方法では、例えばアクチビン以外の誘導因子（例えば FGF）を用いる必要がなく、臍臓として実質的に完成された器官、又は臍臓の形態及び機能を実質的に有する高度に分化した組織が得られるという特徴がある。RAR リガンド及びアクチビンの組み合わせ濃度は適宜選択可能であるが、例えば、RAR リガンドの濃度を $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$ 程度の範囲とし、アクチビンの濃度を 0.1～1000 ng/ml 程度の範囲とすることができる。また、より複雑な構造を有する器官の形成のために、RAR リガンドと RXR リガンドとを組み合わせることもできる。

本発明の方法により形成された器官及び／又は組織は、その器官及び／又は組織を直接又は間接の作用点とする医薬のスクリーニングに用いることができる。例えば、本発明の方法により心臓を形成させた場合、形成された心臓は長期に渡って一定の拍動リズムを有するが、例えばこの心臓を用いて心拍数の増減に作用する医薬をスクリーニングすることが可能である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：RXR リガンドを用いた心臓の形成

ES 細胞として 29 系マウスの E14 細胞 (ATCC #; CRL-1821) 又は C57BL 系マウスの B6 (ATCC #; SCRC-1002) を用いた。0.1% のゼラチンでコートした培養皿に 13 日胚のマウスから作成したマウス胎児繊維芽細胞を播種し、12% 牛胎児血清 (Gibco), 100 U/ml ペニシリン (Sigma), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を含む培地で 24 時間培養した。この細胞を 10 μ g/ml のマイトマイシン C (MMC; Sigma) で 4 時間処理し細胞分裂を阻害した後、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) で 2 回洗浄して MMC を取り除いた。この繊維芽細胞 (フィーダー) の上に ES 細胞を播種した。ES 細胞用培地としては、15% ES 用牛胎児血清 (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Gibco)、MEM non-essential amino acid (Sigma)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco)、0.0007% β -メルカプトエタノール (Sigma)、1000 U/ml Leukemia inhibiting factor (Chemicon)、100 U/ml ペニシリン (Sigma)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma) を含む D-MEM (高グルコース, Gibco) を用い、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、100% 湿度) で 37°C で培養し、培地交換は毎日行った。

継代培養は、ES 細胞を播種してから 72 時間後に行った。ゼラチンコートした培養皿に、MMC 処理したフィーダー細胞 (マウス胎児繊維芽細胞) を 24 時間前に播種しておき、この上に 0.05% トリプシン-0.02% EDTA 処理によって完全に解離した ES 細胞を播種し、コロニーを形成させた (第 1 図参照)。ES 細胞を播種してから 3 日間培養してコロニーを形成させ、このコロニーをピペッティングによって単離した後、細胞接着性の非常に弱いバクテリア用培養皿に播種した。培地としては 15% Knockout SR (KSR, Gibco), 100 U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む D-MEM (高グルコース) を用いた。この状態でさらに 3 日間培養することにより胚様体を作成した (第 2 図)。

この胚様体を 0.1% のゼラチンコートした 24 ウェルプレート (TPP 社製) に 4~6 個ずつ播種し、RXR リガンドとして 1×10^{-5} M の PA024 (2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5,6,7,8-テトラヒドロ-5,5,8,8-テトラメチルナフタレン-2-イル)ア

ミノ]ピリミジン-5-カルボン酸)を添加して2日間培養した。処理開始時を0時間として48~72時間後に自律的に拍動する心筋様細胞の細胞塊が形成された(第3図)。この細胞塊の出現頻度は、0.2細胞塊/胚様体であり、未処理群又は 1×10^{-5} M オールトランスレチノイン酸で処理した対照群では、処理後2週間以内ではほとんど心筋様細胞の分化は認められないため、有意にPA024が作用していると考えられた。一方、 2×10^{-6} M のPA024で処理した胚様体では、出現時期は遅れるものの心筋様細胞塊の出現頻度が高く、72~96時間で0.5細胞塊/胚様体の形成が認められた。これらの細胞塊は、骨格筋様細胞のように繊維状構造を取らず、細胞塊を形成して自立的拍動を続けた。

例2：RXRリガンドを用いた平滑筋及び脂肪細胞の形成

例1と同様にして 1×10^{-5} ~ 2×10^{-6} M のPA024で処理後、培養をさらに続けると約1~2週間で平滑筋様細胞が形成された。この細胞塊は、ゆっくりとしたぜん動運動を示した。頻度は0.1~0.2細胞塊/胚様体であった(第4図)。また、2週間程度で脂肪細胞が出現し始め、20日間培養し続けると全体の30~40%程度が脂肪細胞となった。胚様体あたりの数値に換算するとほぼ100%であった。対照群(1×10^{-5} M のオールトランスレチノイン酸処理)と比較してPA024処理群では形成された脂肪細胞の量は2~3倍多かった(第5図)。

例3：RARリガンドであるAm80とアクチビンとの組み合わせによる膵臓の形成

0.1%ゼラチンで一晩コートした培養用10 cmディッシュ(TPP)に、マイトマイシン-C処理($10 \mu\text{g/ml}$ 、3 hr)して細胞分裂を阻害したマウス胚繊維芽細胞(primary mouse embryonic fibroblast、PMEF)を播種し、1日以上培養してフィーダーレイヤーとして用いた。マウスES細胞として広く用いられているES-E14TG2a(ATCC #CRL-1821)をフィーダーレイヤー上に播種し、培養を行った。ES細胞用培地は、15%牛胎児血清(FBS、Gibco)、非必須アミノ酸、0.007% β -メルカプトエタノール、1000 U/ml Leukemia inhibiting factor (Chemicon)、100 U/ml

ペニシリン、及び 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース、Gibco) 中で行った。培地交換は毎日行なった。

上記の ES 細胞を播種して 72 時間後にコロニーから EB を形成した。ES 細胞のコロニーを Dulbecco の PBS で 1 回洗った後、1 mg/ml コラーゲナーゼ/ディスパーゼ (Roche) を 10cm ディッシュ 1 枚あたり 1 ml ずつ加え、室温で 30~40 秒処理した。約 50% のコロニーが溶液中に浮き上がってきたところで Embryoid medium (EM)、15% Knockout Serum Replacement (KSR、Gibco)、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) を 10cm の培養用ディッシュ 1 枚あたり 13 ml 加えてコロニーを回収した。ES 細胞のコロニーに物理的ダメージを与えないようにしながらメディウムごと 15ml チューブに集め、約 5 分静置した。コロニーが沈殿したところで培地を除き、EM に再懸濁した。この ES コロニーを低接着性の培養 10 cm ディッシュ (Corning または Nunc) に播種して浮遊系で培養を続けた。培地交換は 2 日に 1 回行い、4 日目に胚葉体 (EB) として実験に用いた。

EBs 形成開始から 96 時間後に実体顕微鏡で観察しながら直径 500 μ m 前後の EBs を低接着性の 24 ウェルプレート (Corning または Nunc) に 100 μ l の培地と共に 1 ウェルあたり 1 個ずつ移した。その後で 900 μ l のアクチビン/Am80 (4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル) カルバモイル] 安息香酸) を含む分化誘導培地: 15% KSR, 10 ng/ml アクチビン、0.1 μ M Am80、0.1% BSA、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) を加えて 48 時間培養を続けた。

分化誘導培地で 48 時間 EB 処理した後 (EBs 形成 6 日後)、実体顕微鏡で観察しながら EBs を 0.1% ゼラチンで一晩コートした 24 ウェル組織培養プレート (TPP) に移し、10% KSR、100 U/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (高グルコース) 中で 3 日に一度、培地交換をして培養を続けた。

培養 12 日目 (EB 形成開始からの日数) から 16 日目に腸管様構造が誘導形成され、この誘導形成はアクチビン/Am80 処理した EB のうち 60~70% の割合で認めら

れた。培養 21 日前後になると、その腸様構造が認められた EB のうち約 60%に膵臓組織特異的構造や特異的に分化した細胞が形成された。この膵臓組織では、膵臓導管構造の形成と共に、アミラーゼ分泌顆粒を含む多くの外分泌細胞やインスリンやグルカゴンを産性する内分泌細胞の形態が認められた。胚葉体から分化誘導された膵臓導管や内分泌・外分泌細胞を含む膵臓組織の写真を第 6 図に示す。第 7 図は誘導された膵臓の外分泌細胞を示した写真であり、第 8 図は誘導された膵臓の β 細胞（内分泌細胞）を示した写真である。また抗インスリン抗体や抗アミラーゼ抗体陽性であり、RT-PCR 法による解析では培養 10 日目から 14 日目には PDX-1 や PAX-4、NGN-3 などの膵臓特異的転写因子の発現が持続して観察された。

産業上の利用可能性

本発明の方法により、脊椎動物の未分化細胞から所望の器官、例えば心臓や神経、あるいは膵臓などの器官を形成する手段が提供される。

請求の範囲

1. 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸X受容体リガンドの存在下で培養する工程を含む方法。
2. レチノイン酸X受容体リガンドがレチノイン酸X受容体のアゴニスト又はアンタゴニストである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. レチノイン酸X受容体リガンドが下記の群：

4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, f][1, 4]チアゼピン-11-イル]安息香酸、4-[2, 3-(2, 5-ジメチ-2, 5-ヘキサノ)ジベンゾ[b, e]アゼピン-11-イル]安息香酸、4-[1, 3-ジヒドロ-7, 8-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-1-メチル-2-オキソ-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-5-イル]安息香酸、(Z)-5-[4-[N-メチル-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)カルボキサミド]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン、(Z)-5-[4-[N-メチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ベンジリデン]-2, 4-チアゾリジンジオン、4-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)アミノ]安息香酸、2-[N-シクロプロピルメチル-N-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)アミノ]ピリジン-5-カルボン酸、4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-1, 3-ジオキソラン-1-イル]安息香酸、4-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)エテン-1-イル]安息香酸、6-[1-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-3, 5, 5, 8, 8-ペンタメチルナフタレン-2-イル)シクロプロプ-1-イル]ピリジン-3-カルボン酸、4-(5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-メチル-8-ニトロジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸、4-[5H-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5-n-プロピルジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル]安息香酸、

4-(5H-10, 11-ジヒドロ-2, 3-(2, 5-ジメチル-2, 5-ヘキサノ)-5, 10-ジメチル-8-フェニル-ジベンゾ[b, e][1, 4]ジアゼピン-11-イル)安息香酸、2-[N-(3-n-ヘキシルオキシ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-イル)-N-メチルアミノ]ピリミジン-5-カルボン酸、5-[4-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチルナフタレン-2-yl)フェニル]トロポロン、(2E, 4E, 6Z)-3-メチル-7-(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-3-n-プロピルオキシナフタレン-2-イル)オクタ-2, 4, 6-トリエン酸(LG100754)、及び 4-[N-[3-(2-エチル-o-カルボラン-1-イル)フェニル]-N-メチルアミノ]安息香酸からなる群から選ばれる請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 形成される器官及び／又は組織が心臓、平滑筋組織、又は脂肪細胞組織である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法により形成された器官及び／又は組織。

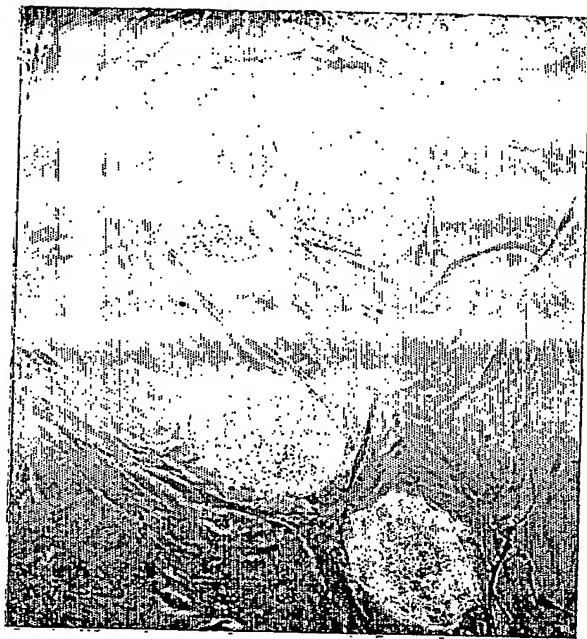
6. 脊椎動物の未分化細胞から器官及び／又は組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸X受容体リガンドを含む分化誘導剤。

7. 脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成する方法、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成する方法であって、脊椎動物の未分化細胞をレチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンド及びアクチビンの存在下で培養する工程を含む方法。

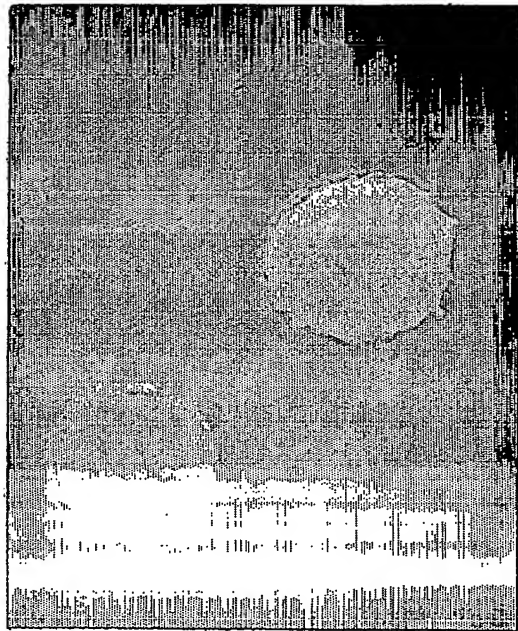
8. レチノイン酸受容体リガンドが 4-[(5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-5, 5, 8, 8-テトラメチル-2-ナフタレニル)カルバモイル]安息香酸である請求の範囲第7項に記載の方法。

9. 脊椎動物の未分化細胞から膵臓をインビトロで形成するための、又は脊椎動物の未分化細胞から膵臓の形態及び機能を有する組織をインビトロで形成するための分化誘導剤であって、レチノイン酸受容体サブタイプγに実質的に結合しないレチノイン酸受容体リガンドを含む分化誘導剤。

第1図



第2図

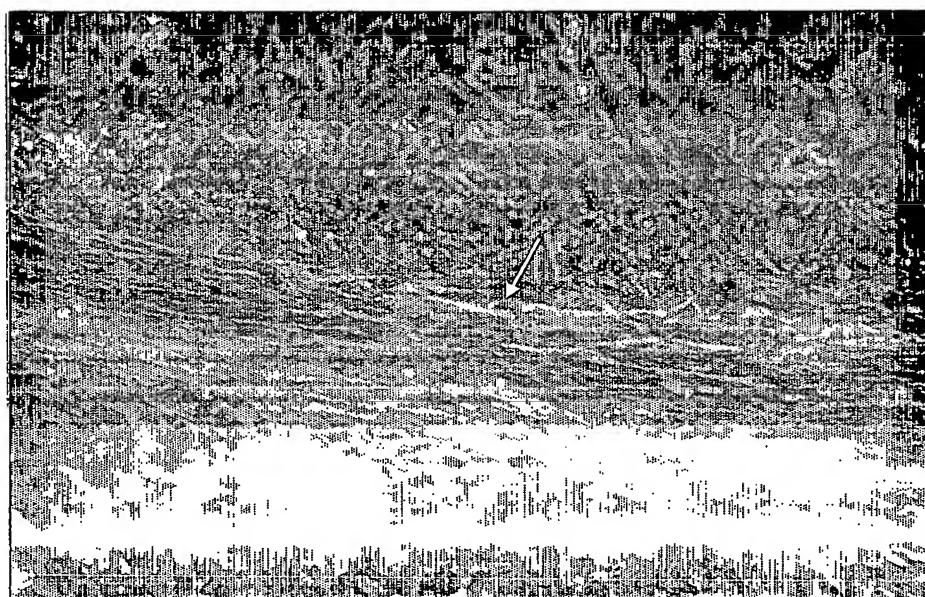


BEST AVAILABLE COPY

第3図

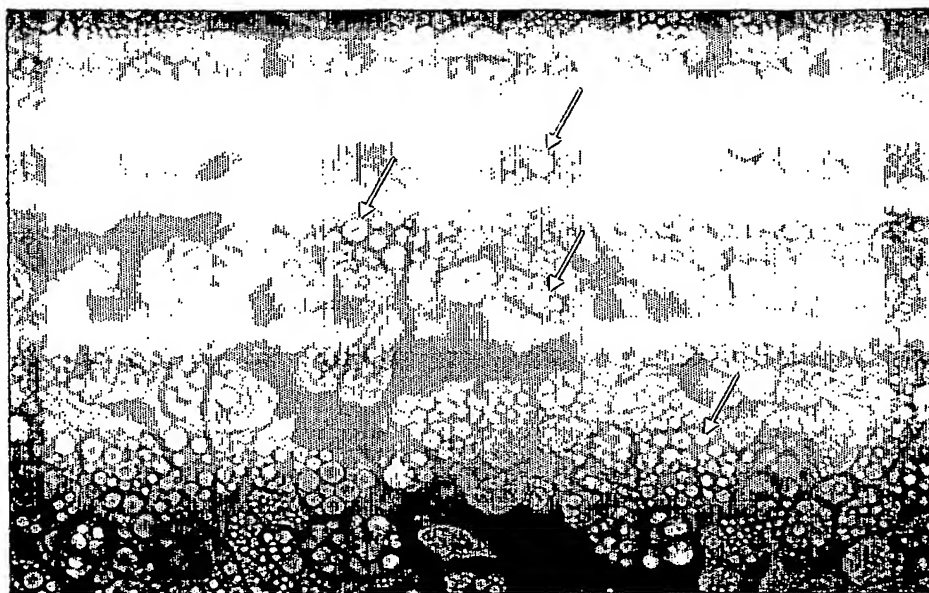


第4図



BEST AVAILABLE COPY

第5図

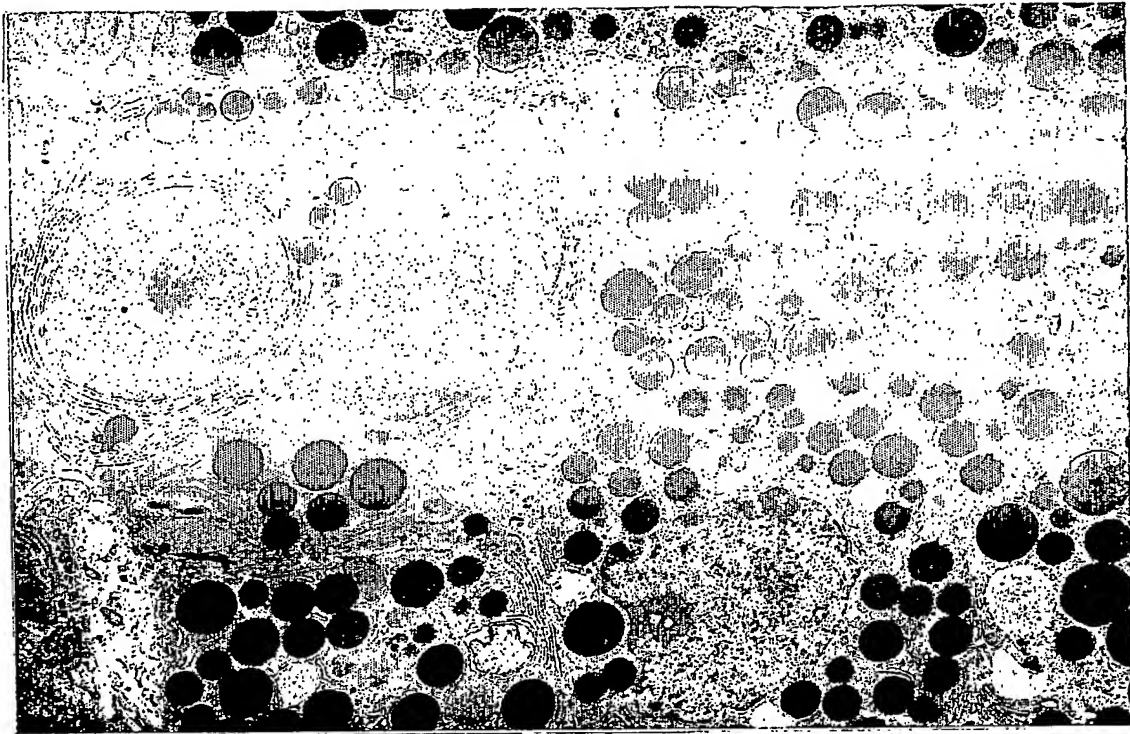


第6図

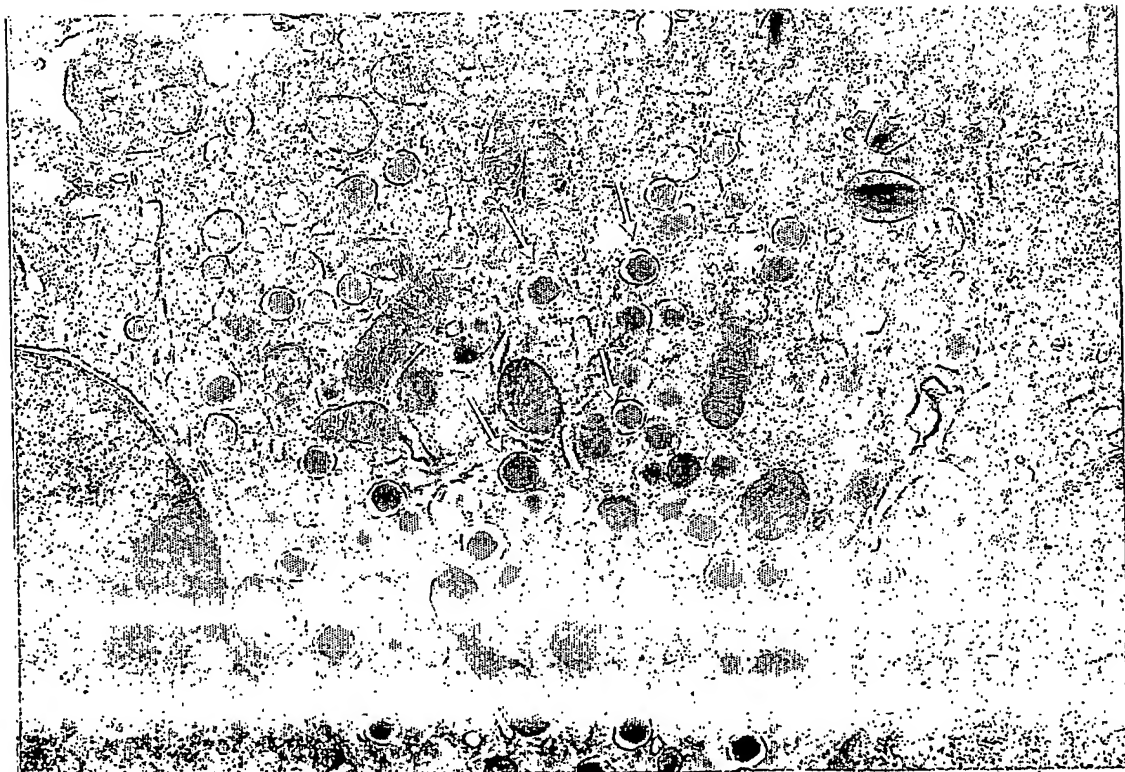


BEST AVAILABLE COPY

第7図



第8図



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTplus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEWTER C.P. et al., Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPAR γ and RXR α agonists, Diabetes. (2002), Vol.51, No.3, p.718-23	1-6
X	Kim M.J. et al., Limited cooperation between peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor agonists in sebocyte growth and development, Mol.Genet.Metab. (2001), Vol.74, No.3, p.362-9	1-6
Y	Million K. et al., Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation, Am.J.Respir. Cell Mol.Biol.(2001), Vol.25, No.6, p.744-50	7-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 April, 2004 (12.04.04)Date of mailing of the international search report
27 April, 2004 (27.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003578

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shibakura M. et al., A retinoic acid receptor- α (RAR α) selective agonist modulates procoagulant activity of acute promyelocytic cells and induces their differentiation into neutrophils, Blood (1998), Vol.91, No.2, p.724-5	7-9
Y	Weston A.D. et al., Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways, J.Cell Biol. (2000), Vol.148, No.4, p.679-90	7-9
Y	EP 1285961 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 26 February, 2003 (26.02.03), & WO 2001/92480 A1 & JP 2001-333770 A & US 2003/0109035 A1 (Claims 30 to 39)	7-9
Y	Nagy L. et al., Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines., Mol.Cell Biol. (1995), Vol.15, No.7, p.3540-51, (table 1)	8
A	EP 1048659 A1 (INSTITUTE OF MEDICINAL MOLECULAR DESIGN, INC.), 02 November, 2000 (02.11.00), & AU 9910525 A & WO 99/24415 A1 & JP 2000-520429 A (Claims 30 to 39)	3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SEWTER C.P. <i>et al.</i> , Regional differences in the response of human pre-adipocytes to PPAR γ and RXR α agonists, Diabetes. (2002), Vol.51, No.3, p.718-23	1-6
X	Kim M.J. <i>et al.</i> , Limited cooperation between peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptor agonists in sebocyte growth and development, Mol Genet Metab. (2001), Vol.74, No.3, p.362-9	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等と言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.2004

国際調査報告の発送日

27.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Million K. <i>et al.</i> , Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2001), Vol. 25, No. 6, p. 744-50	7-9
Y	Shibakura M. <i>et al.</i> , A retinoic acid receptor- α (RAR α) selective agonist modulates procoagulant activity of acute promyelocytic cells and induces their differentiation into neutrophils, Blood (1998), Vol. 91, No. 2, p. 724-5	7-9
Y	Weston A.D. <i>et al.</i> , Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways, J. Cell Biol. (2000), Vol. 148, No. 4, p. 679-90	7-9
Y	EP 1 285 961 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 2003. 02. 26 &WO 2001/92480 A1 &JP 2001-333770 A &US 2003/0109035 A1 (請求項30-39)	7-9
Y	Nagy L. <i>et al.</i> , Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. Mol Cell Biol. (1995), Vol. 15, No. 7, p. 3540-51 (表1)	8
A	EP 1 048 659 A1 (INSTITUTE OF MEDICINAL MOLECULAR DESIGN, INC.) 2000. 11. 02 &AU 9910525 A &WO 99/24415 A1 &JP 2000-520429 A (請求項30-39)	3